

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-110722

(43) 公開日 平成9年(1997)4月28日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 45/00 9/127 31/16 31/70	ADU		A 6 1 K 45/00 9/127 31/16 31/70	ADU L Z
審査請求 未請求 請求項の数 9 F D (全 9 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平7-295918	(71) 出願人	000003159 東レ株式会社 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
(22) 出願日	平成7年(1995)10月20日	(72) 発明者	吉田 純 愛知県名古屋市東区筒井1-4-10
		(72) 発明者	小林 猛 愛知県名古屋市千種区下方町4-29
		(72) 発明者	萩原 正敏 愛知県名古屋市東区矢田2-66
		(72) 発明者	水野 正明 愛知県知多郡東浦町大字緒川字濁池西25-8
		(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外1名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗腫瘍活性物質の腫瘍細胞内導入用イムノリボソーム及びその調製法

(57) 【要約】

【解決手段】 セラミド、抗Fas抗体、マグネタイト及び遺伝子から成る群より選ばれる抗腫瘍活性物質を腫瘍細胞に選択的に反応するモノクローナル抗体（抗CD44抗体）を結合させたカチオン性リボソームに封入又は包埋したことを特徴とするイムノリボソームならびにその調製方法。

【効果】 本発明のイムノリボソームによれば、抗腫瘍活性物質を効率よくかつ選択的に導入してアポトーシスを誘導したり、温熱又は遺伝子治療のベクターとして働きうるので、悪性腫瘍に対する治療に効果的である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗腫瘍活性物質を含むカチオン性リポソーム膜に、腫瘍細胞に選択的に反応するモノクローナル抗体G-22（抗CD44抗体）を結合させたことを特徴とするイムノリポソーム。

【請求項2】 抗腫瘍活性物質が、セラミド、抗Fas抗体、マグネタイト、及び遺伝子から成る群から選ばれたものである、請求項1記載のイムノリポソーム。

【請求項3】 遺伝子が、自殺遺伝子又はサイトカイン遺伝子である請求項2記載のイムノリポソーム。

【請求項4】 サイトカインが、インターフェロン(IFN)- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン(IL)-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$ 、リンホトキシン(LT)- $\beta$ 、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、マクロファージ遊走阻止因子(MIF)、白血病抑制因子(LIF)、T細胞活性化共刺激因子B7(CD80)及びB7-2(CD86)、キット・リガンド、オンコスタチンMから成る群から選ばれたものである、請求項3記載のイムノリポソーム。

【請求項5】 カチオン性リポソーム膜を構成する脂質が、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド(DDAB)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)を含む請求項1記載のイムノリポソーム。

【請求項6】 腫瘍細胞が、CD44過剰発現細胞である請求項1記載のイムノリポソーム。

【請求項7】 CD44過剰発現細胞が、グリオーマ細胞、メラノーマ細胞、肺癌細胞である請求項6記載のイムノリポソーム。

【請求項8】 抗腫瘍活性物質を含むカチオン性リポソーム膜に、腫瘍細胞に選択的に反応するモノクローナル抗体G-22（抗CD44抗体）を添加し、混合し、振盪することを特徴とするイムノリポソームの調製方法。

【請求項9】 抗腫瘍活性物質が、セラミド、抗Fas抗体、マグネタイト、及び遺伝子から成る群から選ばれたものである、請求項8記載のイムノリポソームの調製方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、腫瘍細胞にセラミド又は抗Fas抗体を選択的に導入してアポトーシスを効率良く誘導できるイムノリポソーム、及び腫瘍細胞にマグネタイト又は遺伝子を選択的に導入して温熱又は遺伝子治療のベクターとしての特徴を有するイムノリポソーム、ならびにそれらの調製方法に関する。

## 【0002】

## 【従来技術】

## 1. セラミド又は抗Fas抗体

アポトーシスは、プログラム細胞死（正常な発生、分化

に不可欠な条件としての特定の時期に特定の部位に生じる生理的細胞死）の代表的な死の様式であり、形態学的にはクロマチン凝縮、細胞質濃縮、核濃縮とそれらの断片化、膜被包性球状小体化、隣接するマクロファージや上皮細胞などによる球状小体の食食、消化を特徴としている。従来のがん治療（化学療法、放射線療法等）においては腫瘍細胞の多くはネクローシスにて細胞死がもたらされていた。ネクローシスはアポトーシスと異なり周囲組織に炎症反応を惹起するため、発熱、悪心、嘔吐等強い有害作用が伴っていた。一方アポトーシスは周囲組織に炎症反応を伴わないため有害作用はきわめて少ないと予想される。したがって腫瘍細胞をアポトーシスにて細胞死に至らしめることは臨床応用を展望した際、有害作用を少なくし、効率のよい治療法を導くのに有効であると考えられる。

【0003】 アポトーシスの機構は多様で、まだ解明されていない点が多いが、セラミドの関与するスフィンゴミエリン代謝経路は、サイトカインのひとつであるTNF- $\alpha$ （腫瘍壊死因子）が誘導するプログラム細胞死のアポトイックカスケード中の初期イベントを構成すると見られている [Jarvis WD, Kolesnick RN, Fornari FA, Traylor RS, Gewirtz DA, Grant S, Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 73-77 (1994)]。またスフィンゴミエリンの加水分解によってできるセラミドはアポトーシスだけでなく、細胞増殖及び分化におけるTNF- $\alpha$ の影響を仲介する第二のメッセンジャーであると考えられている [Kolesnick R, Golde DW, The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling, Cell, 77, 325-328 (1994)]。ある種類の細胞において、TNF- $\alpha$ で刺激すればアポトーシスが誘導される。グリオーマ細胞においても一部でアポトーシスの誘導が高用量の場合に限り認められるが、むしろそれは例外的で多くのグリオーマ細胞ではアポトーシスは誘導されない。一方で合成セラミド類縁体であるC2-セラミドをエタノールに溶解して効率よく細胞膜を透過させ、アポトーシスを誘導する方法を示す論文がみられる [Obleid LM, Linardic CM, Karolak LA, Hannun YA, Programmed cell death induced by ceramide, Science, 259, 1769-1771 (1993)] が、グリオーマ細胞では顕著なアポトーシスの誘導はこの方法でも認められない。この事実は種々の細胞にアポトーシスを誘導する抗Fas抗体をグリオーマ細胞に添加したときにも言える。抗Fas抗体は各種細胞にアポトーシスを誘導できる代表的な抗体として特徴づけられているがグリオーマ細胞では高用量の場合のみにその感受性がわずかに認められる。したがって従来の方法ではセラミド又は抗Fas抗体を用いてグリオーマ細胞に効率よくアポトーシスを誘導するためには別のアプローチが望まれるところである。

【0004】2. マグネタイト又は遺伝子  
磁性微粒子であるマグネタイトは局所温熱療法の新しい担い手として注目を集めている。磁性微粒子としてのマグネタイトの発熱機構やその特徴はすでに詳細な検討がなされており、温熱誘導体としての地位は確立されつつある[Shinkai M, Suzuki M, Iijima S, Kobayashi T, Antibody-conjugated magnetoliposomes for targeting cancer cells and their application in hyperthermia, Biotechnol. Appl. Biochem, 21, 125-137 (1994)]。したがって局所温熱療法の成功は腫瘍細胞にいかにか効率よくマグネタイトを導入できるかにかかっている。

【0005】一方、現在多くのヒト遺伝子治療が米国を中心として開始されており、安全性が高く、導入効率も高い脂質カプセルであるリポソームを遺伝子の担体として用いる研究がなされている。例えば、Felgnerらはカチオン性リポソームが核酸やタンパク質を種々の細胞へ運搬する効率的で簡便な手段であることを提供し、また *in vivo* 遺伝子導入において多くの利点を有するものであることを証明した[Felgner PL, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413-7414 (1987), Felgner P L, et al., Nature, 337, 387-388 (1989)]。八木らは、リポソームによる遺伝子導入についてプラスミドのリポソームへの包埋率(リポソーム中に物質を入れることを包埋するという)、細胞への遺伝子導入及び発現効率の面から研究を行ない、リポソームに正の電荷を与える材料として、N-( $\alpha$ -トリメチルアンモニオアセチル)-ジドデシル-D-グルタメイトクロリド(TMAG)を選択し、これとジラウロイルホスファチジルコリン(DLPC)、及びジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)を一定の比率で組み合わせて調製したカチオン性リポソームが高いDNAの取り込みを示し[Koshizaka T, Hayashi Y, Yagi K, Novel liposomes for efficient transfection of  $\beta$ -galactosidase gene into COS-1 cells. J. Clin. Biochem. Nutr. 7, 185-192 (1989)]、また振盪のみにより調製する多重層リポソームでは調製法が簡便である上、安全性が高いことを報告している[Yagi K, Noda H, Kurono M, Ohishi N, Effective gene transfer with less cytotoxicity by means of cationic multilamellar liposomes. Biochem. Biophys. Res. Commun 3, 1042-1048 (1993)]。さらに、カチオン性リポソームのもうひとつの利点は、モノクローナル抗体やリガンドを結合させることによって、特異的な細胞にリポソームを攻撃させることである。本発明者らは八木らと共同にて前記のカチオン性リポソームを用いたヒトグリオーマに対するターゲティング(targeting)療法について研究し、遺伝子導入された細胞の10~20%が *in vitro* でリポソーム-媒介遺伝子導入後に該遺伝子を発現すること、及びリポソームに抗ヒトグリオーマ細胞モノクローナル抗体G-22を結合させることにより、導入効率と腫瘍細胞特異性が向上することを

証明した[Mizuno M, Yoshida J, Sugita K, Inoue I, Seo H, Hayashi Y, Koshizaka T, Yagi K, Growth inhibition of glioma cells transfected with the human  $\beta$ -interferon gene by liposomes coupled with a monoclonal antibody. Cancer Res, 50, 7826-7829 (1990)]。又、これらのモノクローナル抗体のリポソームへの結合は、化学反応、例えばLesermanら[Leserman et al., Nature, 288, 602-604 (1980)]に従い、架橋剤、N-ヒドロキシスクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)を用いることによって行なわれていたものを、本発明者は本研究において化学反応を行なうことなく、振盪するだけという独自の方法により、リポソームへの包埋率、腫瘍細胞への遺伝子導入及び発現効率に優れたイムノリポソームを調製した。

【0006】以上の知見に基づき、セラミド又は抗Fas抗体又はマグネタイト又は遺伝子の腫瘍細胞への導入に、上記のようなイムノリポソームの利用の可能性が大いに期待されるのである

【0007】

【本発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、腫瘍細胞にセラミド又は抗Fas抗体を選択的に導入してアポトーシスを効率良く誘導できるイムノリポソーム、及び腫瘍細胞にマグネタイト又は遺伝子を選択的に導入して温熱又は遺伝子治療のベクターとしての特徴を有するイムノリポソーム、ならびにそれらの調製方法を提供することである。

【0008】

【課題を達成するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく研究を重ねた結果、セラミド、抗Fas抗体、マグネタイト又は遺伝子を腫瘍細胞に選択的に反応するモノクローナル抗体G-22(抗CD44抗体)を結合させたカチオン性リポソームに封入又は包埋させることにより、これらを効率よくかつ選択的に腫瘍細胞に導入できることを証明した。さらに前二者では導入によりグリオーマ細胞にアポトーシスを効率よく誘導できることを見出し、本発明を完成した。

【0009】すなわち本発明は、セラミド、抗Fas抗体、マグネタイト及び遺伝子から成る群から選ばれる抗腫瘍活性物質を腫瘍細胞に選択的に反応するモノクローナル抗体(抗CD44抗体)を結合させたカチオン性リポソームに封入又は包埋したことを特徴とするイムノリポソームならびにその調製方法に関する以下に本発明を具体的に説明する。

【0010】

【発明の実施の形態】

リポソーム膜

本発明の基礎となるリポソーム膜はジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド(DDAB)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)の2種類の脂質とCD44を過剰発現している腫瘍細胞(グリオーマ細胞、メ

ラノーマ細胞、肺癌細胞等)に選択的に反応するモノクローナル抗体(抗CD44抗体)で構成される。リポソームの形状の安定化をはかるためジラウロイルホスファチジルコリン(DLPC)等のコリン脂質を添加する場合もある。構成脂質のひとつであるDDABは正の電荷をリポソームに与える脂質である。かかる脂質を利用することによりリポソームの内外両面が正に荷電され、その結果、負の電荷を有する腫瘍細胞への添加物、すなわち本発明にいう各種抗腫瘍活性物質(セラミド又は抗Fas抗体又はマグネタイト又は遺伝子)の導入効率が向上する。さらに遺伝子ではそのものが負の電荷を有していることによりリポソーム調製の際の封入又は包埋効率の向上にもつながっている。脂質の構成モル比はDDAB、DOPEで2:1又は1:2とすることが例示され、適当量の添加物を加えてもよい。

#### 【0011】腫瘍細胞に導入する抗腫瘍活性物質

本発明において腫瘍細胞へ導入する抗腫瘍活性物質は、腫瘍細胞に導入されて抗腫瘍効果を発揮しうるものであればその機構は問わない。具体的には腫瘍細胞に選択的に導入されてアポトーシスを効率良く誘導できるもの、例えばセラミド(C<sub>2</sub>若しくはC<sub>6</sub>セラミド又はその他のアポトーシスを誘導できるセラミド類縁体)、抗Fas抗体、又は腫瘍細胞に選択的に導入されて温熱治療効果を発揮しうるマグネタイト、さらには抗腫瘍に有効な遺伝子をいう。抗腫瘍に有効な遺伝子としては、好適には自殺遺伝子、具体的にはヘルペスシンプレックスチミジンキナーゼをコードする遺伝子、又はサイトカイン遺伝子、具体的にはインターフェロン(IFN)- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン(IL)-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$ 、リンホトキシン(LT)- $\beta$ 、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、マクロファージ遊走阻止因子(MIF)、白血病抑制因子(LIF)、T細胞活性化共刺激因子B7(CD80)及びB7-2(CD86)、キット・リガンド、オノコスタチンM等の各種サイトカインをコードする遺伝子が挙げられる。本発明において使用される上記の遺伝子は、公知の技術を用いて細胞から単離して得られたcDNAであっても、また公知の文献等に開示される情報よりポリメラーゼ連鎖反応(PCR)等の方法に従って化学的に合成されたものであってもよいが、免疫的拒絶反応を最小に抑えるために、また、治療効果を上げるために、ヒト由来のものが望ましい。

#### 【0012】G-22モノクローナル抗体(抗CD44抗体)

本発明者らの研究によりヒトグリオーマ細胞、メラノーマ細胞、又は肺癌細胞の一部はリンパ球のhoming receptorとして同定されたCD44が過剰に発現しているという事実が見い出されている。この事実に基づき、ヒトグリ

オーマ細胞に対する特異的抗体(抗CD44抗体)の作製が行われた[Wakabayashi T, Yoshida J, Seo H, et al., Characterization of neuroectodermal antigen by a monoclonal antibody and its application in CSF diagnosis of human glioma. J Neurosurg, 68, 449-455 (1988), Okada H, Yoshida J, Seo H, et al., Anti-(glioma surface antigen) monoclonal antibody G-22 recognized overexpressed CD44 in glioma cells. Cancer Immunol. Immunother. 39, 313-317 (1994)]。作製は、常套的な手段、すなわち該細胞上に発現される抗原で免疫化したマウスの脾細胞と骨髓腫細胞を融合し、得られたハイブリドマを培養することによって行うことができる。またモノクローナル抗体は、全IgGであっても、その一部、例えばF(ab')<sub>2</sub>のいずれであってもよい。

#### 【0013】腫瘍細胞

本発明においてイムノリポソームによる治療の対象となる腫瘍細胞はCD44過剰発現細胞であるグリオーマ細胞、メラノーマ細胞又は肺癌細胞等である。

#### 【0014】イムノリポソームの調製

本発明のイムノリポソームの調製方法としては、多重層リポソームの調製の際の常套的な手段である振盪法に若干の改良を加えた方法にて行いうる。具体的にはクロロホルムに溶解した前記の脂質ないし混合脂質(セラミドの場合はクロロホルムに溶解後この時点でリポソーム脂質といっしょに混合する)をスピッツに加え、ロータリーエバポレータにて溶媒を蒸発させリポソーム膜を調製する。これに抗Fas抗体又はマグネタイト又は遺伝子を含むリン酸緩衝液を加え、さらにG-22モノクローナル抗体(抗CD44抗体)を1 $\mu$ molに対して2ngから2 $\mu$ gの割合で添加し、1から5分間振盪する。脂質と他の添加物(モノクローナル抗体を含む)の混合比は脂質1 $\mu$ molあたりモノクローナル抗体は2ngから2 $\mu$ g、マグネタイトは5から30 $\mu$ g、遺伝子は5から30 $\mu$ gが例示される。

#### 【0015】製剤化

クロロホルムに溶解した前記の脂質ないし混合脂質(セラミドの場合はクロロホルムに溶解後この時点でリポソーム脂質といっしょに混合する)をスピッツに加え、ロータリーエバポレータにて溶媒を蒸発させリポソーム膜を調製する。この方法に準じリポソーム膜のバイアル化を計り滅菌保存する。脂質の酸化を防ぐため冷所保存が望ましい。一方、その他の添加物である抗体又はマグネタイト又は遺伝子はそれぞれ別のバイアルとし、保存する。この場合も冷所保存が望ましい。この添加物のバイアル(場合によっては2種類)とリポソーム膜のバイアルを使用直前に混合し、振盪後使用する。

【0016】本発明のイムノリポソームの投与形態としては、腫瘍病巣又は腫瘍に対応した予想播種又は転移部位に対して局所注射する他、場合によっては通常の静脈

内、動脈内等の全身投与が挙げられる。本発明のイムノリボソームの投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数によって異なるが、成人一日当り、脂質量に換算して10から1000nmolの範囲とすることが適当である。

#### 【0017】

【実施例】本発明を以下の実施例によりさらに詳細に説明する。これらの実施例は説明のためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

#### 【実施例1】セラミド含有イムノリボソームの調製

##### (1) セラミド及びリボソーム用脂質

C2-セラミドをMATREYA INC., Pleasant Gap, PA, USAより; ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド(DDAB)、ジラウロイルホスファチジルコリン(DLPC)をSigma Chemical Co., St., Louis, MOより; そしてジオレオイルホスファチジルーエタノールアミン(DOPE)をAvanti Polar Lipids, Birmingham, ALより購入し、これを用いた。

##### 【0018】(2) G-22 モノクローナル抗体の調製

ヒトグリオーマ細胞の表面抗原(CD44)に特異的なG-22モノクローナル抗体(マウスIgGモノクローナル抗体)は、Wakabayashi, T. et al., J. Neurosurg., 68, 449-455, (1988)の記載に従って行った。まずヒトグリオーマ細胞株SK-MG-4で免疫化したマウスの脾臓細胞をマウスミエローマ細胞株NS-1とDippold WG, Lloyd KO, Li LYC et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6114-6118 (1980)に従って融合した。グリオーマ細胞、神経芽腫、及び他の腫瘍細胞由来の培養細胞株のパネル上における培養上清中の抗体活性をモニターしながら、ハイブリドーマを選択し、限界希釈法にてクローニングを行った。選択したハイブリドーマをBALB/cマウスに接種し、腹水より目的とするモノクローナル抗体を得た。

##### 【0019】(3) リボソームの調製

リボソームの調製は、多重層リボソームの調製の際の常套的手段である振盪法に若干の改良を加えた簡便法により行った。まず、DDAB、DOPE及びC2-セラミドを1:2:2又は1:2:4(全量2  $\mu$ mol)の割合でクロロホルムに溶解混合し、シリコン化した試験管の底でロータリーエバポレーターを用いて溶媒除去した。この脂質フィルムに、(2)で調製した2  $\mu$ gのG-22モノクローナル抗体を含むダルベッコのリン酸緩衝液500  $\mu$ lを加えた。脂質フィルムとリン酸緩衝液を含む試験管を混合物が清浄になるまで1~5分間振盪することによって、目的とするセラミド-イムノリボソームを得た。

##### 【0020】(4) セラミドの腫瘍細胞への導入

ヒトグリオーマ細胞 U-251SP, SK-MG-1, 及びT98Gを10%ウシ胎児血清(FCS)、ストレプトマイシン(100  $\mu$ g/ml)、ペニシリン(100U/ml)、4mM L-グルタミン酸及び非必須アミノ酸を添加したDulbecco's minimum essential medium (DMEM)で維持した。

【0021】上記グリオーマ細胞の培養培地懸濁液(7.5  $\times 10^5$  cells/ml)2mlをファルコン(Falcon)プレート(#3046)の各ウェルに播き、5%CO<sub>2</sub>、95% 空気の湿雰囲気下、37°Cで24時間インキュベートした。リボソーム溶液30  $\mu$ l (60nmol 脂質)を、モル比率が1:2:2(=DDAB:DOPE:C2-セラミド)のときセラミドの最終濃度が12  $\mu$ Mとなるように、又はモル比率が1:2:4(=DDAB:DOPE:C2-セラミド)のときセラミドの最終濃度が24  $\mu$ Mとなるように培養培地に加えた。37°Cで16時間培養後、培地を交換し、細胞をさらに37°Cで一定時間インキュベートした。コントロールとなる空リボソームをDDAB, DLPC, 及びDOPEを用い、モル比率をそれぞれ1:2:2で調製した。

#### 【0022】【試験例1】

##### (1) DNA断片化の分析

(方法) DNA断片化の分析を、[Jarvis WD, Kolesnick RN, Fornari FA, Traylor RS, Gewirtz DA, Grant S, Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91, 73-77 (1994)]に記載の方法に若干の改良を加えた2%アガロースゲル電気泳動によって行った。セラミド-イムノリボソーム(24  $\mu$ M)処理2日後、浮遊細胞又は固着細胞を回収し、0.5% SDS/0.1 M NaCl/1mM EDTA, pH7.5に溶解し、その溶解液をプロテナーゼK(100  $\mu$ g/ml)で50°C、12時間処理した。プロテナーゼKを94°C、5分間熱変性することによって不活化し、1/10容量の3M酢酸ナトリウム及び2.5倍容量の冷エタノールをDNAを沈殿させるために加えた。溶解液を-70°Cで15分保持し、30,000  $\times$ gで10分間遠心分離した。最後にペレットをTE20  $\mu$ lに溶解し、0.4  $\mu$ g/mlのエチジウムブロミドを含む2%アガロースゲルで電気泳動した。解像パターンはUV光下で可視化した。

【0023】(結果)セラミド-イムノリボソームにて処理した培養細胞から抽出したDNAは、アポトーシスの特徴であるオリゴヌクレオソームDNA断片のハシゴ型の電気泳動プロフィールを示した(図1)。

【0024】(2)セラミド-リボソームの培養細胞に対する抗腫瘍効果

(方法)セラミド-イムノリボソーム、又は抗体を結合させずに同様に調製したセラミドリボソーム[モル比率1:2:2(=DDAB:DOPE:C2-セラミド); 培地中のセラミド最終濃度12  $\mu$ M、又はモル比率1:2:4(=DDAB:DOPE:C2-セラミド); 培地中のセラミド最終濃度24  $\mu$ M]を用い、培養グリオーマ細胞に導入したセラミドの成長阻害効果を調べた。培養グリオーマ細胞にリボソーム処理して48時間後、ヘモサイトメーター下でトリパンブルー染色を排除した生細胞数の計測によって評価した。コントロールとして、空リボソーム又はエタノール-溶解セラミド(エタノール中4mM)による処理を行った。

【0025】(結果)表1において、細胞毒性(%)、即ち未処理細胞に対する生存細胞数の減少率を各リボソ

ーム型及び細胞株について示した。コントロールの空リポソームによっては何ら顕著な細胞毒性は観察されなかったのに対し、セラミドリポソーム $12\mu\text{M}$ では3種全ての細胞において細胞毒性が表れ、セラミドーイムノリポソーム $12\mu\text{M}$ では、さらに高い細胞毒性を示し、抗体の結合によりさらに効果が上昇することがわかった。エタノール-溶解リポソームの場合と比較した student-t test ( $p<0.01$ )による統計的差異は、セラミドーイムノリポソームにより処理したU-251SP 及びSK-MG-1、ならびにセラミドーイムノリポソーム処理の全ての細胞において見ら

れた。

【0026】また、セラミドリポソーム $24\mu\text{M}$ はセラミドリポソーム $12\mu\text{M}$ に比べて高い細胞毒性を示し、その効果は用量依存的であることがわかるが、その用量依存性は、セラミドーイムノリポソームにおいても同様に見られた。また、SK-MG-1 及びT98Gに統計的差異が見られた。

【0027】

【表1】

処理リポソーム	細胞株		
	U-251SP	SK-MG1	T98G
空リポソーム	2.0±0	5.8±2	8.1±1.2
エタノール-溶解セラミド ( $12\mu\text{M}$ )	7.5±1	35.4±2	50.0±2.4
セラミドリポソーム ( $12\mu\text{M}$ )	34.7±2 *	54.6±1.5 *	60.6±1.4
セラミドーイムノリポソーム ( $12\mu\text{M}$ )	56.3±2.5 *	63.8±1.5 *	80.3±0.7 *
エタノール-溶解セラミド ( $24\mu\text{M}$ )	33.1±1.5	39.2±3	56.1±2.4
セラミドリポソーム ( $24\mu\text{M}$ )	44.2±2.5	69.1±0.35*	81.8±0.3 *
セラミドーイムノリポソーム ( $24\mu\text{M}$ )	61.8±2	72.4±1.7 *	86.3±0.6 *

細胞毒性 (%)

\* 統計的差異あり student-t test ( $p<0.01$ )

【0028】〔実施例2〕 抗Fas抗体含有イムノリポソームの調製

(1) 抗Fas抗体及びリポソーム用脂質

抗Fas抗体はMedical and biological laboratories (MBL), Co., Ltd., Nagoya, Japanより購入した。リポソーム用脂質は前記のごとくである。

【0029】(2) G-22モノクローナル抗体 (抗CD44抗体)

前記のごとくである。

【0030】(3) 抗Fas抗体含有イムノリポソームの調製

抗Fas抗体含有イムノリポソームの調製は多重層リポソームの調製の際の常套的な手段である振盪法に若干の改良を加えた方法にて行なった。まずリポソームの形状の安定化をはかる目的にてジラウロイルホスファチジルコリン (DLPC) 等のコリン脂質を添加した。すなわちDDA、B、DOPE、コリン脂質をそれぞれモル比で1:2:2又は1:3:2の割合でクロロホルムに溶解混合し、シリコン化したスピッツの底でロータリーエバポレータを用いて溶媒の除去を行なった。この脂質フィルム (リポソーム膜) にリン酸緩衝液に溶解した抗Fas抗体を脂質総量 $1\mu\text{mol}$  に対して2ngから $2\mu\text{g}$ の割合で添加し、さらにG-22モノクローナル抗体 (抗CD44抗体) を脂質

総量 $1\mu\text{mol}$  に対して2ngから $2\mu\text{g}$ の割合で添加し、1から5分間振盪した。さらにその後リン酸緩衝液を加え、全量を $500\mu\text{l}$ に調製した。この方法にて目的とする抗Fas抗体含有イムノリポソームを得た。

【0031】〔試験例2〕 抗Fas抗体含有イムノリポソームの培養細胞に対する抗腫瘍効果

(1) 抗Fas抗体含有イムノリポソームの培養細胞に対する抗腫瘍効果

(方法) 抗Fas抗体含有イムノリポソームを15ないし30nmol脂質/mlの割合で培養グリオーマ細胞に添加し、グリオーマ細胞の成長阻害効果を調べた。対象としてフリーの抗Fas抗体を同量添加した。

【0032】(結果) 表2において、細胞毒性 (%)、即ち未処理細胞に対する生存細胞数の減少率を各リポソーム型及び細胞株について示した。抗Fas抗体及び抗Fas抗体含有イムノリポソームのいずれにおいてもすべての培養細胞株にて細胞毒性が観察された。その細胞毒性はフリーの抗Fas抗体を添加した場合よりも抗Fas抗体含有イムノリポソームのほうが統計学的に有意な差をもって強いものであった。またその細胞毒性の形態はTUNEL法によりアポトーシスであることが証明された。

【0033】

【表2】

細胞株

	U-251 SP	SK-MG-1	T98G
空のリボソーム	1.2 ± 0.3	4.2 ± 1.8	5.0 ± 1.1
抗Fas抗体			
0.1 μg	4.3 ± 0.7	2.5 ± 0.4	3.2 ± 1.5
1.0 μg	8.4 ± 2.5	10.1 ± 2.1	12.7 ± 3.0
100 μg	56.7 ± 4.4	60.3 ± 3.8	58.9 ± 5.5
リボソーム			
抗体量			
0.1 μg	52.2 ± 3.8	48.3 ± 5.4	50.1 ± 6.3
1.0 μg	78.4 ± 4.5	67.5 ± 4.7	67.4 ± 3.8
イムノリボソーム			
抗体量			
0.1 μg	69.3 ± 4.1	64.5 ± 3.4	66.6 ± 4.2
1.0 μg	88.7 ± 6.3	80.5 ± 7.1	85.3 ± 3.9

【0034】[実施例3] マグネタイト含有イムノリボソームの調製

(1) マグネタイト及びリボソーム用脂質

マグネタイトは、Sinkai M, Honda H, Kabayashi T, Preparation of fine magnetic particles and application for enzyme immobilization Biocatalysis, 5, 61-69 (1991)の方法に従い調製した。

【0035】リボソーム用脂質は前記のごとくである。

【0036】(2) G-22モノクローナル抗体 (抗CD44抗体)

前記のごとくである。

【0037】(3) マグネタイト含有イムノリボソームの調製

マグネタイト含有イムノリボソームの調製は多重層リボソームの調製の際の常套的な手段である振盪法に若干の改良を加えた方法にて行なった。まず形状の安定化をはかる目的にてジラウロイルホスファチジルコリン (DLP C) 等のコリン脂質を添加した。DDAB、DOPE、コリン脂質をそれぞれモル比で1:2:2の割合でクロロホルムに溶解混合し、シリコン化したスピッツの底でロータリーエバポレータを用いて溶媒の除去を行なった。この脂質フィルム (リボソーム膜) にリン酸緩衝液に溶解したマグネタイトを脂質総量1 μmolに対して20 μgの割合で添加し、さらにG-22モノクローナル抗体 (抗CD44抗体) を脂質総量1 μmolに対して2 ngから2 μgの割合で添加し、1から5分間振盪した。さらにその後リン酸緩衝液を加え、全量を500 μlに調製した。この

方法にて目的とするマグネタイト含有イムノリボソームを得た。

【0038】[試験例3] マグネタイト含有イムノリボソームによる培養細胞の鉄の取り込み

(1) マグネタイトの取り込み

(方法) マグネタイト含有イムノリボソームを15ないし30 nmol脂質/mlの割合で培養グリオーマ細胞に添加し、グリオーマ細胞のマグネタイトの取り込み量を調べた。対象としてフリーのマグネタイトを同量添加した。細胞内のマグネタイトの取り込み量は細胞を濃塩酸で溶解後、TCAにて細胞溶解物を除去し、StClを添加し、原子吸光分析にてマグネタイトの濃度を測定し、マグネタイト量を算出した。

【0039】(結果) 表3において、培養グリオーマ細胞に取り込まれたマグネタイトの量を各リボソーム型について示した。同量のフリーのマグネタイトを培養グリオーマ細胞に添加したときには細胞内へのマグネタイトの取り込みはほとんど観察されなかった。一方、マグネタイト含有イムノリボソームでは大量のマグネタイトの取り込みが観察された。その取り込み量は従来のホスファチジルコリンやホスファチジルセリン又はコレステロールといった脂質で調製されたリボソームの10倍以上であった。また鉄の取り込み量は抗CD44抗体を結合させたイムノリボソームで抗CD44抗体を結合していない通常リボソームより有意に高まった。

【0040】

【表3】

	細胞株		
	U-251 SP	SK-MG-1	T98G
リボソーム			
	17.0	18.0	19.0
イムノリボソーム			

数値はマグネタイト含有リボソーム又はイムノリボソーム投与後16時間での細胞ひとつあたりのマグネタイトの取り込み量 (pg-Fe304/cell) を示す。

【0041】【実施例4】 遺伝子含有イムノリボソームの調製

(1) 遺伝子及びリボソーム用脂質

遺伝子はpCHI10 (ファルマシアより購入)、pSV2IFN- $\beta$  (東レ株式会社より供与) 等の真核細胞発現ベクターを用いた。リボソーム用脂質は前記のごとくである。

【0042】(2) G-22モノクローナル抗体 (抗CD 44抗体)

前記のごとくである。

【0043】(3) 遺伝子含有イムノリボソーム調製

遺伝子含有イムノリボソームの調製は多重層リボソームの調製の際の常套的な手段である振盪法に若干の改良を加えた方法にて行なった。まず形状の安定化をはかる目的にてジラウロイルホスファチジルコリン (DLPC) 等のコリン脂質を添加した。DDAB、DOPE、コリン脂質をそれぞれモル比で1:2:2の割合でクロロホルムに溶解混合し、シリコン化したスピッツの底でロータリーエバポレータを用いて溶媒の除去を行なった。この脂質フィルム (リボソーム膜) にリン酸緩衝液に溶解した遺伝子を脂質総量1  $\mu$ mol に対して20  $\mu$ g の割合で添加し、さ

らにG-22モノクローナル抗体 (抗CD44抗体) を脂質総量1  $\mu$ mol に対して2ngから2  $\mu$ g の割合で添加し、1から5分間振盪した。さらにその後リン酸緩衝液を加え、全量を500  $\mu$ l に調製した。この方法にて目的とする遺伝子含有イムノリボソームを得た。

【0044】【試験例4】 遺伝子含有イムノリボソームによる培養細胞での遺伝子の発現

(1) 遺伝子の発現

(方法) 遺伝子含有イムノリボソームを15ないし30 nmol脂質/mlの割合で培養グリオーマ細胞に添加し、グリオーマ細胞での導入遺伝子の発現を調べた。対象としてフリーの遺伝子を同量添加した。

【0045】(結果) 表4において、培養グリオーマ細胞に導入された遺伝子の発現を各リボソーム型について示した。同量のフリーの遺伝子を培養グリオーマ細胞に添加したときにはその発現は全く観察されなかった。一方遺伝子含有イムノリボソームではその発現が観察された。また導入遺伝子の発現は抗CD44抗体を結合させたイムノリボソームで抗CD44抗体を結合していない通常リボソームより有意に高まった。

【0046】

【表4】

	細胞株		
	U-251 SP	SK-MG-1	T98G
空のリボソーム	2.5 >	2.5 >	2.5 >
フリーの遺伝子	2.5 >	2.5 >	2.5 >
リボソーム			
7.5 nmol	23.8 $\pm$ 4.0	30.7 $\pm$ 4.8	39.8 $\pm$ 8.8
15.0 nmol	52.0 $\pm$ 7.8	60.8 $\pm$ 5.6	77.8 $\pm$ 12.7
30.0 nmol	126.3 $\pm$ 12.1	112.1 $\pm$ 10.7	168.3 $\pm$ 17.5
イムノリボソーム			
7.5 nmol	85.0 $\pm$ 7.6	88.9 $\pm$ 8.5	63.3 $\pm$ 9.7
15.0 nmol	175.8 $\pm$ 10.8	170.5 $\pm$ 11.6	140.8 $\pm$ 15.3
30.0 nmol	256.3 $\pm$ 15.7	240.4 $\pm$ 14.7	263.3 $\pm$ 19.5

数値は遺伝子導入後4日目の培養液中の $\beta$ -インターフェロン濃度 (IU/ml) を示す。

【0047】

【発明の効果】本発明のセラミド含有イムノリボソーム又は抗Fas抗体含有イムノリボソームによれば、腫瘍細胞にセラミド又は抗Fas抗体を効率よくかつ選択的に導入してアポトーシスを誘導できるので、悪性腫瘍に対する治療に効果的である。またこれらはアポトーシスの機構の解明に役立つと考えられる。

【0048】本発明のマグネタイト含有イムノリボソ

ムによれば、フリーに添加されたマグネタイトよりはるかに効率よく腫瘍細胞にマグネタイトを導入できるので、悪性腫瘍に対する局所温熱治療に効果的である。本発明の遺伝子含有イムノリボソームによれば、効率よく遺伝子を腫瘍細胞に導入でき、発現できるので、悪性腫瘍に対する遺伝子治療に効果的である。

30 【図面の簡単な説明】

【図1】 セラミドイムノリボソーム処理によりグリ

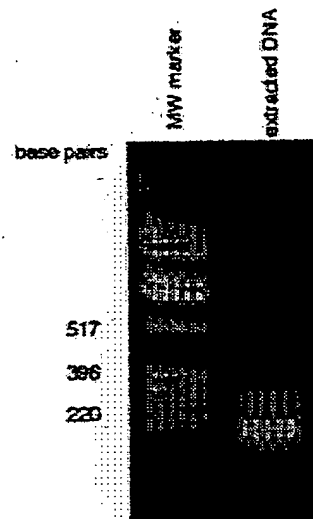


オーマ細胞から抽出したDNAのアガロールゲル電気泳  
動写真を示す。

レーン1: 分子量マーカー  
レーン2: 抽出DNA

【図1】

図画代用写真



レーン1 レーン2

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K	33/26		A 6 1 K	33/26
	31/715			39/395
	39/395			48/00
	48/00		A 6 1 N	1/40
// A 6 1 N	1/40		A 6 1 K	37/20

(72) 発明者 岡田 秀穂  
愛知県名古屋市昭和区川名町4-26ミラ川  
名301号